

© БЛАГОДАТОВА А. В., КОЧКИНА К. В., КОМАРОВА М. А., ТРОФИНА Н. Ю., ПЕТРОВА М. М., ПРОТОПОПОВ А. В.

УДК 577.29

DOI: 10.20333/2500136-2021-2-100-103

Селекция аптамеров к тромбоцитам с применением цифровой эмульсионной ПЦР

А. В. Благодатова¹, К. В. Кочкина¹, М. А. Комарова¹, Н. Ю. Трофина², М. М. Петрова¹, А. В. Протопопов¹

¹Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск 660022, Российская Федерация

²Красноярский краевой центр крови № 1, Красноярск 660022, Российская Федерация

Цель исследования. Получить аптамеры-ингибиторы гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов, блокирующие агрегацию тромбоцитов.

Материал и методы. Селекцию аптамеров к IIb/IIIa рецепторам тромбоцитов осуществляли по методу SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), модифицированному для селекции аптамеров к определенному эпитопу. Метод позволяет отобрать и провести эволюцию в пробирке аптамеров с селективностью к определенной мишени из большой библиотеки олигонуклеотидов. Аффинность аптамеров к IIb/IIIa рецепторам тромбоцитов осуществляли с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Получены пулы аптамеров, обладающие высокой аффинностью к к IIb/IIIa рецепторам тромбоцитов. Исследование антиагрегационных свойств пулов с наилучшим связыванием показала, что агрегация тромбоцитов была минимальной в случае использования аптамеров пула 5-го раунда селекции. Таким образом, аптамеры этого пула имеют наибольший потенциал быть использованными в качестве аналога синтетического пептида, блокирующего тромбоагрегацию. Аптамеры данного пула были взяты на секвенирование с целью получения последовательностей аптамеров с наилучшими антиагрегационными свойствами.

Заключение. Получены пулы аптамеров, обладающие высокой аффинностью к IIb/IIIa рецепторам тромбоцитов и противосвёртывающей активностью.

Ключевые слова: аптамеры, технология SELEX, тромбоциты, рецепторы IIb/IIIa, агрегация тромбоцитов, фактор Виллебранда.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Благодатова АВ, Кочкина КВ, Комарова МА, Трофина НЮ, Петрова ММ, Протопопов АВ. Селекция аптамеров к тромбоцитам с применением цифровой эмульсионной ПЦР. *Сибирское медицинское обозрение.* 2021;(2):100-103. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-100-103

Aptamers selection for platelets using droplet digital PCR

A. V. Blagodatova¹, K. V. Kochkina¹, M. A. Komarova¹, N. Y. Trofina², M. M. Petrova¹, A. V. Protopopov¹

¹Professor V. F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

²Krasnoyarsk Regional Blood Center № 1, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

The aim of the research. To obtain aptamers-inhibitors of platelet glycoprotein IIb / IIIa receptors, blocking platelet aggregation.

Material and methods. The selection of aptamers for IIb / IIIa receptors of platelets was carried out according to the SELEX method (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), modified to select aptamers for a specific epitope. The method allows selection and in vitro evolution of aptamers with selectivity to a specific target from a large library of oligonucleotides. The affinity of aptamers for platelet IIb / IIIa receptors was determined using flow cytometry.

Results. Pools of aptamers with high affinity for IIb / IIIa platelet receptors were obtained. The study of the antiaggregation properties of the pools with the best binding showed that platelet aggregation was minimal when using the aptamers from the pool of the 5th round of selection. Thus, the aptamers of this pool have the greatest potential to be used as an analogue of a synthetic peptide that blocks thromboaggregation. Aptamers from this pool were taken for sequencing in order to obtain sequences of aptamers with the best antiaggregatory properties.

Conclusion. Pools of aptamers with high affinity for IIb / IIIa receptors of platelets and anticoagulant activity were obtained.

Key words: aptamers, SELEX method, platelets, IIb / IIIa receptors, thromboaggregation, von Willebrand factor.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Blagodatova AV, Kochkina KV, Komarova MA, Trofina NY, Petrova MM, Protopopov AV. Aptamers selection for platelets using droplet digital PCR. *Siberian Medical Review.* 2021; (2):100-103. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-100-103

Введение

По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти, немалый процент от этой группы занимают острые состояния, вызванные процессами тромбообразования в условиях повышенной активности тромбоцитов [1, 2]. Для эффективной терапии необходимо сочетать чрескожное коронарное вмешательство с применением фармакологических препаратов, направленных

на снижение тромбообразования [3]. В ряде случаев пациентам после проведенного вмешательства требуется дополнительная медикаментозная терапия, позволяющая сократить агрегацию тромбоцитов. Агрегация и адгезия тромбоцитов начинается в результате активированных рецепторов IIb/IIIa тромбоцитов с фибриногеном и фактором фон Виллебранда, поэтому разработка препаратов-ингибиторов гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов является

актуальной задачей [4, 5]. Применение существующих препаратов сопряжено с высоким риском развития кровотечений, также известно, что их эффективность со временем ослабевает, поэтому они не подходят для длительной терапии и профилактики острого коронарного синдрома [6, 7].

В настоящее время все более широкое распространение получают аптамеры – ДНК или РНК олигонуклеотиды, способные специфично связываться с заданной мишенью. Аптамеры имеют ряд преимуществ, благодаря которым, их применение для блокировки рецепторов Пб/Ша тромбоцитов может стать гораздо перспективнее существующих пептидных блокаторов. Для терапевтических аптамеров возможно создание мгновенно действующих антидотов – комплементарных последовательностей [8]. Существующие технологии позволяют достаточно быстро подобрать высокоспецифичные аптамеры с высокой аффинностью к конкретному рецептору. Применение аптамеров может стать более перспективным по сравнению с антителами и пептидами, поскольку они гораздо дешевле, не иммуногены, не токсичны, к ним легко создать антидот.

Материал и методы

Для селекции аптамеров к Пб/Ша рецепторам тромбоцитов за основу был взят метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [9], модифицированный для селекции аптамеров к определенному эпитопу [10]. Метод позволяет отобрать и провести эволюцию в пробирке аптамеров с селективностью к определенной мишени из большой библиотеки олигонуклеотидов (рис.).

Первые 5 раундов проводили стандартную селекцию к целым тромбоцитам. Для этого в первом раунде тромбоциты инкубировали в 1 мкМ растворе 80 нуклеотидной исходной «Гарвардской» библиотеки в фосфатном буфере. Не связавшиеся последовательности удаляли. Олигонуклеотиды, связавшиеся с тромбоцитами, выделяли и проводили их ПЦР-реакцию с полимеразой, которая при амплификации допускает ошибки, то есть производит не всегда точные копии олигонуклеотида. Таким образом, постепенно в процессе селекции происходит эволюция исходного пула, в результате чего пул обогащается последовательностями, имеющими наилучшее связывание с мишенью. Во второй и последующие раунды

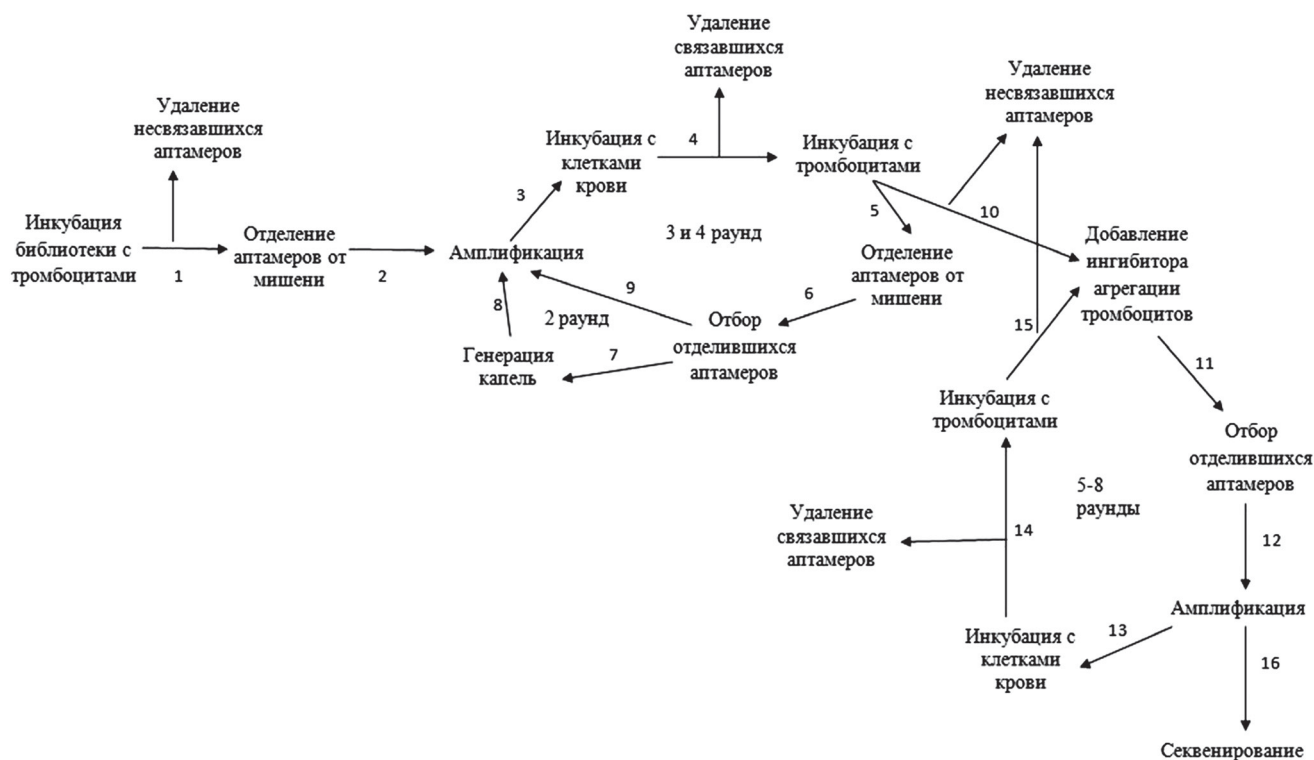


Рисунок. Схема селекции аптамеров с применением цифровой эмульсионной ПЦР. 1, 2 – позитивная селекция в первом раунде; 3-8 – отбор аптамеров во втором раунде (эмульсионная ПЦР); 3-6, 9 – чередование негативной и позитивной селекции в 3 и 4 раунде; 3, 4, 10-15 – селекция в 5-8 раундах с применением ингибитора агрегации тромбоцитов – синтетического пептида; 16 – секвенирование пулов, получившихся в ходе 8 раундов селекции.

Figure. Aptamer selection scheme using digital emulsion PCR. 1, 2 – positive selection in the first round; 3-8 – selection of aptamers in the second round (emulsion PCR); 3-6, 9 – alternation of negative and positive selection in the 3rd and 4th round; 3, 4, 10-15 – selection in 5-8 rounds using a platelet aggregation inhibitor – a synthetic peptide; 16 – sequencing of the pools resulting from 8 rounds of selection.

селекции инкубацию тромбоцитов проводили в 200 нМ растворе пула аптамеров (обогащенной библиотеки), полученного во время предыдущего раунда селекции. Во втором раунде селекции применялась технология цифровой капельной ПЦР (Droplet Digital PCR, ddPCR). Суть метода заключается в разделении реакционной смеси на 20 тысяч капель объемом 1 нл. Каждая капля служит сосудом для ПЦР, таким образом, становится возможным амплификация сверхмалого количества ДНК-олигонуклеотидов [11]. В каждую каплю в среднем попадает по несколько матриц ДНК, таким образом происходит увеличение количества копий абсолютно всех цепочек олигонуклеотидов (в том числе с большим содержанием GC), а не только тех, которые для полимеразы более предпочтительны в ходе реакции [12]. Для того чтобы исключить возможность связывания выбранных аптамеров с клетками крови, проводили негативную контр-селекцию к клеткам крови. Для выбора аптамеров, связывающихся именно с IIb/IIIa рецепторами тромбоцитов в 5 раунде после проведения стадий негативной и позитивной селекции, к аптамерам, связавшимся с тромбоцитами добавляли в избытке синтетический циклический пептид, содержащий 6 аминокислот и меркаптопропиононовый остаток – дезаминоцистеинил. Этот ингибитор агрегации тромбоцитов подавляет агрегацию тромбоцитов, предупреждая связывание фибриногена, фактора Виллебранда и других адгезивных лигандов с гликопротеиновыми IIb/IIIa рецепторами тромбоцитов. Дальнейшую работу проводили с аптамерами, которые отделились от мишени. Следующие 3 раунда проводили селекцию конкурентным вытеснением аптамеров с поверхности IIb/IIIa рецепторов синтетическим пептидом. Связывание всех полученных в ходе селекции пулы аптамеров с тромбоцитарной фракцией крови проверяли с помощью проточной цитометрии. При добавлении избытка синтетического пептида – блокатора IIb/IIIa рецепторов аптамеры практически полностью вытеснялись с поверхности пулов 5-го и 6-го раундов селекции, что свидетельствует о том, что большинство олигонуклеотидов занимают именно эпитоп связывания пептида с рецептором.

Результаты и обсуждение

Антиагрегационные свойства пулов с наилучшим связыванием (3, 4, 5, 6) были проверены на тромбоцитах. Тромбоцитарная фракция крови инкубировалась с пулами аптамеров и пептидом в качестве положительного контроля, такое же количество физиологического раствора было добавлено в образцы отрицательных контролей. Исследования проводились в 3-х повторностях. Агрегация тромбоцитов была минимальной в случае использования аптамеров пула 5-го раунда селекции и синтетического пептида.

Именно поэтому аптамеры этого пула имеют наибольший потенциал быть использованными в качестве аналога синтетического пептида, блокирующего тромбоагрегацию. Повышенная по сравнению с отрицательными контролями агрегация тромбоцитов наблюдалась в образцах, в которые был добавлен пул 3-го раунда селекции.

Пулы 2, 3, 4, 5, 6 раундов были отправлены на секвенирование. Будет проведен математический анализ данных секвенирования, изучены закономерности эволюции аптамеров к рецептору и выявлены последовательности с наиболее вероятным хорошим связыванием, эти аптамеры, а также их антитоды будут синтезированы. Антиагрегационные свойства каждого синтетического аптамера будут проверены *in vitro* на культурах тромбоцитов и *in vivo* на животных моделях.

Заключение

Получены пулы аптамеров, высокоаффинные рецепторам тромбоцитов IIb/IIIa, представляющие собой кандидаты для разработки нетоксичного и дешёвого препарата, предотвращающего агрегацию тромбоцитов и обладающего противосвёртывающей активностью.

Литература / References

1. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology. *American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association*. 2004; 110(9):82-292.
2. Valgimigli M, Campo G, Percoco G. Comparison of angioplasty with infusion of tirofiban or abciximab and with implantation of sirolimus-eluting or uncoated stents for acute myocardial infarction: the multistrategy randomized trial. *The Journal of the American Medical Association*. 2008; (299):1788-1799.
3. Serruys PW, Foley DP, Pieper M. The TRAPIST Study: a multicenter randomized placebo controlled clinical trial of Trapidil for prevention of restenosis after coronary stenting, measured by 3-D intravascular ultrasound. *European Heart Journal*. 2001; (22):1938-1947.
4. Brener SJ. Insights into the pathophysiology of ST-elevation myocardial infarction. *American Heart Journal*. 2006; 151(6):4-10.
5. De Luca G, van 't Hof AW, Ottervanger JP, Hoorntje JC, Gosselink AT, Dambrink JH, Zijlstra F, de Boer MJ, Suryapranata H. Unsuccessful reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary angioplasty. *American Heart Journal*. 2005; 150(3):557-62.
6. Kirtane AJ, Sandhu P, Mehran R, McEntegart M, Cristea E, Brener SJ, Xu K, Fahy M, Genereux P,

Wessler JD, Stone GW. Association between intraprocedural thrombotic events and adverse outcomes after primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*. 2014; 113(1):36-43.

7. Батыралиев ТА, Преображенский ДВ, Фетцер ДВ, Сидоренко БА, Патараева СА. Антиагрегационные препараты при острых коронарных синдромах и чрескожных коронарных вмешательствах: в фокусе тирофибан. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2008; 7(6):79-88. [Batyraliev TA, Preobrazhensky DV, Fetzer DV, Sidorenko BA, Pataraya SA. Antiplatelet drugs in acute coronary syndromes and percutaneous coronary interventions: in the focus of tirofiban. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2008; 7(6):79-88. (In Russian)]

8. Мазуров АВ, Спиридонова ВА. Аптамеры – новые фармакологические субстанции для антикоагулянтов. *Атеротромбоз*. 2017; (1): 34-144. [Mazurov AV, Spiridonova VA. Aptamers are new pharmacological substances for the development of anticoagulants. *Atherothrombosis*. 2017; (1):134-144. (In Russian)]

9. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990; 249(4968): 505-510. DOI: 10.1126 /science.2200121

10. Zamay GS, Kolovskaya OS, Ivanchenko TI, Zamay TN, Vepritsev DV, Grigorieva VL, Garanga II, Krat AV, Glazyrin YE, Gargaun A, Lapin IN, Svetlichnyi VA, Kichkailo AS. Development of DNA Aptamers to Native EpCAM for Isolation of Lung Circulating Tumor Cells from human Blood. *Cancers*. 2019; 11(359): 1-14.

11. Yufa R, Krylova SM, Bruce C, Bagg EA, Schofield CJ, Krylov SN. Emulsion PCR Significantly Improves Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures-Based Aptamer Selection: Allowing for Efficient and Rapid Selection of Aptamer to Unmodified ABH2 Protein. *Analytical Chemistry*. 2015; 87(2): 1411-1419.

12. Shao K, Ding W, Wang F, Li H, Ma D, Wang H. Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection. *PLoS One*. 2011; 6(9): 1-7.

Сведения об авторах

Благодатова Анна Владимировна, к.б.н., старший научный сотрудник, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(967)6179899, e-mail: annablagodatova@mail.ru

Кочкина Ксения Владимировна, к.м.н., ассистент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(923)3551629, e-mail: kkkksenya@yandex.ru

Комарова Мария Андреевна, младший научный сотрудник, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(950)9858129, e-mail: rockmarys@gmail.com

Трофина Наталья Юрьевна, заведующий отделом заготовки крови и ее компонентов, Красноярский краевой центр крови № 1; адрес: Российская Федерация, 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3м; тел.: +7(391)2200611, e-mail: trofinanatalya@yandex.ru

Петрова Марина Михайловна, д.м.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201901, e-mail: stk99@yandex.ru

Протопопов Алексей Владимирович, д.м.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201395, e-mail: rector@krasgmu.ru

Author information

Anna V. Blagodatova, Cand.Biol.Sci., Senior Researcher, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7 (967)6179899, e-mail: annablagodatova@mail.ru

Ksenia V. Kochkina, Cand.Med.Sci., Assistant, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(923)3551629, e-mail: kkkksenya@yandex.ru

Maria A. Komarova, Researcher, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(950)9858129, e-mail: rockmarys@gmail.com

Natalia Y. Trofina, Head of the Department of Blood Preparation and Its Components, Krasnoyarsk Regional Blood Center No. 1; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str. 3m., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2200611, e-mail: trofinanatalya@yandex.ru

Marina M. Petrova, Dr.Med.Sci., Professor, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2201901, e-mail: stk99@yandex.ru

Alexey V. Protopopov, Dr.Med.Sci., Professor, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2201395, e-mail: rector@krasgmu.ru

Дата поступления: 17.02.2021

Дата рецензирования: 18.03.2021

Принята к печати: 31.03.2021

Received 17 February 2021

Revision Received 18 March 2021

Accepted 31 March 2021